

**DETECTION OF HLA****Publication number:** JP8308596 (A)**Publication date:** 1996-11-26**Inventor(s):** KAWAI SHINTARO; MAEKAWAJIRI SHINJI; NAKAMOTO HIROTAKA**Applicant(s):** WAKUNAGA PHARMA CO LTD**Classification:**

**- international:** *G01N33/53; C07H21/04; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/566; G01N33/53; C07H21/00; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/566; (IPC1-7): C12Q1/68; C07H21/04; C12N15/09; G01N33/53; G01N33/566*

**- European:****Application number:** JP19960053480 19960311**Priority number(s):** JP19960053480 19960311; JP19950051437 19950310**Abstract of JP 8308596 (A)**

**PURPOSE:** To conduct a typing of a HLA-DR antigen more completely through the presence/absence of the complementarity to each of specific 16 kinds of oligonucleotides. **CONSTITUTION:** The typing of a HLA-DR antigen is properly accomplished by using 16 kinds of probes described below (including complementary strands) prepared by the procedure described in the Japanese Patent (Disclosure) No. 5-192198: CGGTTGCTGGAAAGATGCATC; ACACTCCCTCTTAGGCTG; GGCCGGGTGGACAACTAC; ATGTTTAACCTGCTCCAA; CCTGATGAGGAGTACTGCAA; AGCTACTGCGCTTCGAC; CGTAGAGTACTCCAAGAA; CTTATACTTACCCTGCCA; AGACAGGCGGGCCCT; TCAAACCTTATCCTGCTTC; AAACCTTAACCTCCTCCAA; ACTCTACGTCTGAGTGTC; ACGGGTGAGTGTTATTTC; GACCTCCTGGAAGACAGG; ACTTCCTGGAAGACGAGC; CCCGTAGTTGTGTCTGCA.

Data supplied from the *esp@cenet* database — Worldwide

Family list  
2 application(s) for: JP8308596 (A)

- 1

**DETECTION OF HLA**

**Inventor:** KAWAI SHINTARO ; MAEKAWAJIRI SHINJI (+1)

**EC:**

**Publication info:** JP8308596 (A) — 1996-11-26

**Applicant:** WAKUNAGA PHARMA CO LTD

**IPC:** G01N33/53; C07H21/04; C12N15/09; (+12)
- 2

**Detection of HLA-DR**

**Inventor:** KAWAI SHINTARO [JP] ; MAEKAWAJIRI SHINJI [JP] (+1)

**EC:** C12Q1/68M4

**Publication info:** US5939542 (A) — 1999-08-17

**Applicant:** WAKUNAGA SEIYAKU KK [JP]

**IPC:** C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): C07H21/04

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-308596

(43)公開日 平成8年(1996)11月26日

(51)Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 15/09	Z N A		G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/53			33/566	
33/566		9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 9 頁)				

(21)出願番号 特願平8-53480

(22)出願日 平成8年(1996)3月11日

(31)優先権主張番号 特願平7-51437

(32)優先日 平7(1995)3月10日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000250109

湧永製薬株式会社

大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号

(72)発明者 川 井 信太郎

大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号

湧永製薬株式会社内

(72)発明者 前川 尻 真 司

大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号

湧永製薬株式会社内

(72)発明者 中 本 裕 隆

大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号

湧永製薬株式会社内

(74)代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

(54)【発明の名称】 H L A の検出

## (57)【要約】

【課題】 より簡便にかつ大量の検体を検査でき、現在日本人での存在が知られているすべてのタイプのH L A - D R 抗原のタイピングが可能なプローブセットの提供。

【解決手段】 下記の配列1~16で示されるオリゴヌクレオチドおよび/またはその相補鎖の一部または全部からなるプローブセット。

【化1】

配列1: CGGTTGCTGGAAAGATGCATC

配列2: A C A C T C C C T C T T A G G C T G

配列3: G G C C G G G T G G A C A A C T A C

配列4: A T G T T T A A C C T G C T C C A A

配列5: C C T G A T G A G G A G T A C T G G A A

配列6: A G C T A C T G C G C T T C G A C

配列7: C G T A G A G T A C T C C A A G A A

配列8: C T T A T A C T T A C C C T G C C A

配列9: A G A C A G G C G G G C C C T

配列10: T C A A A C T T A T C C T G C T T C

配列11: A A A C T T A A C C T C C T C C A A

配列12: A C T C T A C G T C T G A G T G T C

配列13: A C G G G T G A G T G T T A T T T C

配列14: G A C C T C C T G G A A G A C A G G

配列15: A C A T C C T G G A A G A C G A G C

配列16: C C C G T A G T T G T G T C T G C A

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の配列1～16で示されるオリゴヌクレオチドおよび／またはその相補鎖の一部または全部からなる、HLA-DR抗原の遺伝子のタイピングに用いられるプローブセット。

配列1: CGGTTGCTGGAAAGATGCATC

配列2: ACACTCCCTCTTAGGCTG

配列3: GGCCGGGTGGACAACTAC

配列4: ATGTTTAACTGCTCCAA

配列5: CCTGATGAGGAGTACTGGAA

配列6: AGCTACTGCGCTTCGAC

配列7: CGTAGAGTACTCCAAGAA

配列8: CTTATACTTACCTGCCA

配列9: AGACAGGCGGGCCCT

配列10: TCAAACCTTATCCTGCTTC

配列11: AAACCTTAACTCCTCCAA

配列12: ACTCTACGTCTGAGTGTC

配列13: ACGGGTGAGTGTTATTTTC

配列14: GACCTCCTGGAAGACAGG

配列15: ACATCCTGGAAGACGAGC

配列16: CCCGTAGTTGTGTCTGCA

【請求項2】核酸試料と、請求項1記載のオリゴヌクレオチドおよび／またはその相補鎖の一部または全部との相補性の有無を検出することを含んでなる、HLA-DR抗原の遺伝子のタイピング法。

【請求項3】核酸試料が、下記の配列17および18:

配列17: CCGCTGCACTGTGAAGCTCT

配列18: TCGTGTCCCCACAGCACGT

で表されるオリゴヌクレオチドをプライマーとして増幅されたものである、請求項2記載のHLA-DR抗原の遺伝子のタイピング法。

【請求項4】HLA-DR抗原の遺伝子タイピング用キットであって、

固相担体と、標識プライマーとを含んでなり、前記固相担体には、請求項1に記載のオリゴヌクレオチドおよび／またはその相補鎖の一部または全部を含む一本鎖核酸が固定されてなり、該オリゴヌクレオチドおよびその相補鎖のそれぞれは1またはそれ以上繰り返し述べていてもよく、

前記標識プライマーが請求項3に記載の配列17および18で表される配列を含んでなるプライマーであることを特徴とする、キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の背景】

## 発明の分野

本発明は、HLA（ヒト白血球抗原）のタイピングに用いられるプローブ群に関し、更に詳しくはHLAのうちDR抗原を遺伝子型にタイピングするのに用いられるプローブ群に関する。

2

## 【0002】背景技術

臓器移植を行う場合、臓器の提供者と患者の間でHLAの型がどれだけ一致しているかが移植成功率に大きく影響する。HLAが一致しない場合、拒絶反応のため臓器が患者に生着しなかったり、逆に提供者由来の免疫細胞のためにGVHDが発生し患者の生命が危険にさらされることになる。また糖尿病など特定の病気の発症率とHLAの型の関連も指摘されている。HLAのタイピングはこのような医療技術の高度化に従い重要性を増したといえる。

【0003】従来HLAのタイピングは抗体を用いて行われてきた。しかし抗体はその供給源を経済的にほぼ限られている上、モノクローナル抗体を得ることが困難なこともあり、優れた品質の抗体を安定して十分量得ることは困難であるといえる。この問題はHLAの中でも特にクラスII抗原について顕著となってきている。

【0004】そのため、従来の抗体による検査法に代わり、特異性の面で安定した、しかも検査用の試薬の供給に制限の無い遺伝子によるタイピング法が研究され、種々の方法が提案されている。また日本骨髄バンク等世界中で骨髄や腎臓を中心として臓器移植ネットワークが徐々に規模を拡大してきている。そのためますます、試薬による量的制限のない遺伝子タイピングで大量の検体を低コストでタイピングできるものが求められてきている。

【0005】従来、PCR-RFLP法、PCR-SSO法、PCR-SSP法、PCR-SSCP法等が提案されている（今日の移植VOL. 7 SUPPL 1994）。また、国際HLAワークショップ（第11回1991年）ではPCR-SSO法について、標準の反応条件、プライマー、およびプローブを定めている。

【0006】上記種々の提案にもかかわらず、より簡便な方法への希求が依然として存在している。骨髄バンク事業等でのスクリーニングにおいて不可欠な条件としては、（1）操作が簡易でかつ大量検体処理に適している、（2）対象の集団に見られるほぼ全てのタイプを検出できる、（3）分類のレベルが適当で、最終検査の実施対象を実用上支障のない程度の数に絞り込むこと、そして（4）作業量、試薬のコスト等とのバランスが取れていることなどが挙げられる。

【0007】本発明者らは先に、第23回日本免疫学会において12種類のプローブを用いたHLA-DR抗原のタイピングを提案している。

## 【0008】

【発明の概要】本発明者らは、今般、先に提案した上記12種類のプローブに加え、さらに4種類のプローブ、またはこれらの相補鎖を組み合わせて用いることにより、より完全にHLA-DR抗原のタイピングが可能であるとの知見を得た。本発明はかかる知見に基づくものである。すなわち、本発明はより簡便にかつ大量の検体

を検査できるHLA-DR抗原のタイピングが可能なプローブセットの提供をその目的としている。

【0009】また本発明は、現在日本人での存在が知られているすべてのタイプの判定が可能なプローブセットの提供をその目的としている。

【0010】本発明によるプローブセットは、下記の配列1～16で示されるオリゴヌクレオチドおよび/またはその相補鎖の一部または全部からなるもの、である。

配列1: CGGTTGCTGGAAAGATGCATC

配列2: ACACTCCCTCTTAGGCTG

配列3: GGCCGGGTGGACAACCTAC

配列4: ATGTTTAACTTGCTCCAA

配列5: CCTGATGAGGAGTACTGGAA

配列6: AGCTACTGCGCTTCGAC

10

\*配列7: CGTAGAGTACTCCAAGAA

配列8: CTTATACTTACCCTGCCA

配列9: AGACAGGCGGGCCCT

配列10: TCAAACCTTATCCTGCTTC

配列11: AAACCTTAACCTCCTCCAA

配列12: ACTCTACGTCTGAGTGTC

配列13: ACGGGTGAGTGTTATTTTC

配列14: GACCTCCTGGAAGACAGG

配列15: ACATCCTGGAAGACGAGC

配列16: CCCGTAGTTGTGTCTGCA

【0011】上記の配列1～16で示されるオリゴヌクレオチドの相補鎖は、具体的には、下記の配列1a～16aで示されるオリゴヌクレオチドである。

\*

配列1a: GATGCATCTTTCCAGCAACCG

配列2a: CAGCCTAAGAGGGAGTGT

配列3a: GTAGTTGTCCACCCGGCC

配列4a: TTGGAGCAGGTTAAACAT

配列5a: TTCCAGTACTCCTCATCAGG

配列6a: GTCGAAGCGCAGTAGCT

配列7a: TTCTTGGAGTACTCTACG

配列8a: TGGCAGGGTAAGTATAAG

配列9a: AGGGCCCGCCTGTCT

配列10a: GAAGCAGGATAAGTTTGA

配列11a: TTGGAGGAGGTTAAGTTT

配列12a: TGCAGACACAACCTACGGG

配列13a: GAACTCAGACGTAGAGT

配列14a: GAAATAACACTCACCCTG

配列15a: CCTGTCTTCCAGGAGGTC

配列16a: GCTCGTCTTCCAGGATGT

【0012】

【発明の具体的説明】本発明によるプローブセットに用いられる配列は、上記配列1～16の一部または全部および1a～16aの一部または全部である。これらの配列は、それぞれHLA-DR抗原の遺伝子にそのタイプに対応してハイブリダイズする。すなわち、被験者由来のDNA、好ましくは白血球より抽出されたDNAと、上記配列のいずれがハイブリダイズするかにより、HL

A-DR抗原のタイピングを行う。

【0013】それぞれの配列がハイブリダイズするHLA-DR抗原のタイプは以下のとおりである。この表を判定表としてHLA-DR抗原のタイプを判定することができる。

【0014】

【表1】

HLA-DR遺伝子タイプ		本発明による配列															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
DR1	*0101/0102	●															●
	*0103	●															●
DR2	*1501-1503/1601		●														●
	*1602		●												●		●
DR3	*0301-0303			●				●					●				●
	*0401/0403-0411/(1410)			●													●
DR4	*0402			●												●	●
	*0422			●					●								●
DR11	*1101/1103/1104				●		●					●					●
	*1102				●		●					●				●	●
DR12	*1201/1202					●								●			●
DR6	*1301/1302/1304						●								●		●
	*1303/1305-1/1401/1402/1405-1409						●						●				●
	*1403						●			●			●		●		●
	*1404/(0805)						●						●				●
DR7	*0701							●									●
DR8	*0801-0804							●		●				●			●
DR9	*0901										●						●
DR10	*1001											●					●

●：ハイブリダイズすることを意味する。

【0015】また、本発明においては、上記配列1～16またはその相補鎖の組み合わせと比較すると、ややその反応性に劣るが、配列5は下記配列19または20と、配列6は下記配列21～24のいずれか一つと置換\*

配列19：CCTGATGAGGAGTACTGGAACAG  
 配列20：TGATGAGGAGTACTGGAA  
 配列21：AGTGTCTCTCCAGTAACC  
 配列22：AGCCCCCTGCGCTTTCGAC  
 配列23：AGCTCATGCGCTTTCGAC  
 配列24：AGCTCCAGCGCTTTCGAC

これらの配列と試料DNAとのハイブリダイゼーションの有無は、通常用いられる条件下で確認されてよい。

【0017】本発明の好ましい態様によれば、上記配列は特開平5-192198号公報に記載の方法によって、固相、好ましくはマイクロタイタープレートに一本鎖核酸として固定化されてタイピングに利用されるのが好ましい。まず、上記配列を1またはそれ以上繰り返し（好ましくはタンデムに）含む配列を得て、それを例えばM13ファージ、ファージとプラスミドの複合ベクター（例えばpUC118、pBSM13+、PUCf1等）に組み込み、一本鎖核酸を得る。特に、上記配列を5～200コピー導入したベクターから得られる一本鎖核酸を用いるのが好ましい。次に、この一本鎖核酸を固相に固定化する。

【0018】これらの一本鎖核酸を固定化する担体としては、核酸が非特異的に吸着しうるもの、あるいは、官能基が導入できその官能基と核酸との間で共有結合できるものであればいずれの材質のものも、また、いずれの形状のものも利用可能である。その具体例としては、いわゆるポリマー製のマイクロプレート、チューブ、ビーズ形状のものがあげられる。特にマイクロプレートを用いるのが、その機械化の容易性から好ましい。

\*してHLA-DR遺伝子のタイピングを行うことができる。但し、これらの配列を利用する場合には、判定時に交差反応に注意するなどの配慮が必要である。

【0016】

【0019】前記した一本鎖核酸をこれらの担体に固定化する方法としては、まず化学結合法が挙げられる（Nucleic Acids Res., 15, 5373-5390 (1987)）。化学結合によって核酸を固定化する方法の具体例としては、アミノ基を導入した担体と核酸をグルタルアルデヒドのような架橋剤を用いて両者を結合させる方法が挙げられる。また、核酸に官能基（例えばトランスアミナーゼ反応により1級のアミノ基）を導入し、適当な架橋剤を用いて担体上に導入された官能基と結合させることも有効である。

【0020】また、吸着などの非特異的結合によって核酸を直接担体に固定することもできる。特に担体がマイクロプレートである場合は、紫外線照射またはMgCl<sub>2</sub>の添加により吸着効率をあげることが可能である（特開昭61-219400号公報）。さらに、核酸とタンパク質を適当な方法によって化学結合あるいは非特異的に吸着させ、そのタンパク質と担体との非特異的吸着を利用して固定化する方法なども有効である。

【0021】本発明において、上記固相に固定化された配列と試料DNAとのハイブリダイゼーション反応の条件は適宜選択、決定されてよい。例えば、本工程でのハイブリダイゼーション反応は、基本的には、従来の膜を

用いるハイブリダイゼーションと同様に行なうことができる[B. D. Hanes and S. J. Higgins, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press (1985)]。

【0022】試料DNAとしては、ヒト白血球由来のDNAであるのが好ましい。この試料の検出される目的配列は、上記配列とのハイブリダイズを検出可能なように標識されているのが好ましい。標識化の方法としては、

例えば、(1) 目的核酸に標識物を直接導入する方法、  
(2) 標識化されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用して目的核酸に相当する核酸あるいは目的核酸と相補的な核酸を合成する方法、(3) 標識化された単位核酸の存在下、オリゴヌクレオチドプライマーを使用して目的核酸に相当する核酸あるいは目的核酸と相補的な核酸を合成する方法などが具体例としてあげられる。

【0023】(1) の目的核酸に標識物を直接導入する方法としては、目的核酸に光反応でビオチン誘導体を導入し酵素を結合したストレプトアビジンで検出する方法[Nucleic Acids Res., 13, 745 (1985)]、目的核酸をスルホン化し酵素標識抗スルホン化抗体を用いて検出する

方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3466-3470 (1984)]などが、操作の簡便性、迅速性の点から好ましい。  
【0024】一方、前記(2)および(3)の方法としては、特定の核酸配列を増幅する方法[BIO/TECHNOLOGY, 8, 291 (1990)]を利用することができる。これらの方法は目的核酸を増幅するという点で特に注目されているが、そののみならず、比較的簡単に目的核酸に相当する合成核酸あるいは目的核酸と相補的な合成核酸を標識化できる点でも利用価値が高い。例えば、PCR法[Science, 230, 1350-1354 (1985)]にあっては、標識したプライマーを利用するか、あるいは、標識したモノヌクレオチドトリリン酸を利用することにより、標識された伸長生成物または増幅生成物を得ることができる。また、Q $\beta$ レプリカーゼを利用する増幅法[BIO/TECHNOLOGY, 6, 1197 (1988)]にあっては、同様に標識したモノヌクレオチドトリリン酸を利用することによって標識された伸長生成物または増幅生成物を得ることができる。また、前述した以外の核酸増幅法においても、伸長反応または増幅反応によって取り込まれるモノヌクレオチドトリリン酸やオリゴヌクレオチドを標識しておくことによって伸長生成物または増幅生成物を標識することができる。特に(2)の方法が本発明にあっては好ましい。

【0025】ここで使用する標識物質とは、ハイブリダイゼーション操作後にこの物質を検出し得るものであるならば、放射性、非放射性を問わない。取扱いの容易性、保存性、廃棄処理等から、また本発明の効果を最もよく享有するものとして、非放射性的の標識物質が好ましい。

【0026】非放射性的の標識物質としては、例えばビオチン、2, 4-ジニトロフェニル基、ジギキシゲニン等のハプテン、フルオレセインおよびその誘導体(例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)等)、ローダミンおよびその誘導体(例えば、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)、テキサスレッド等)、4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラン(NBDF)およびダンシルなどの蛍光物質あるいはアクリジン等の化学発光物質が挙げられる。これらによりオリゴヌクレオチドを標識する場合は、いずれも公知手段(特開昭59-93098号、特開昭59-93099号各公報参照)により、標識化を行うことができる。また、ヌクレオチド三リン酸を標識する場合は公知手段[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4045 (1983)、特開昭63-152364公報]に準じて行なうか、市販品を利用することができる。

【0027】本発明の好ましい態様によれば、この試料DNAの標識は標識化されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、PCR法によって増幅と同時に行われるのが好ましい。さらに本発明の最も好ましい態様によれば、標識されたプライマーとして下記の配列17および18を用いるのが好ましい。

配列17: CCGCTGCACTGTGAAGCTCT

配列18: TCGTGTCCTCCACAGCACGT

このプライマーの使用により、非特異的な反応が防止され、HLA-DR抗原をコードする遺伝子のみを増幅することができ、より明確なタイピングを行うことができる。

【0028】本発明において、上記配列と試料DNAとのハイブリダイズの有無を検出する操作は、存在する標識の種類に応じて適宜選択され、決定されてよい。

【0029】ここで、目的核酸に存在する標識が直接検出可能なものである場合、すなわち標識が例えばラジオアイソトープ、蛍光物質、色素などである場合には、標識核酸が固相に結合した状態で検出操作を行うかまたは標識物を核酸と結合したまま、あるいは標識物を核酸から切り放した状態で溶液中に遊離させた後、その標識に応じた方法によって検出操作を行なう。また、標識が間接的に検出可能なものである場合、すなわち標識が例えばビオチン、ハプテンなどの特異的結合反応のリガンドである場合、一般的にそれらの検出に用いられているように、直接信号を発生する標識あるいは信号を発生する反応を触媒する酵素を結合した受容体(たとえばアビジンまたは抗体)を使用して検出操作を行う。

【0030】

【実施例】

実施例1

特開平5-192198号公報に開示された方法に従い、下記の第1表に示される16種類の配列のそれぞれについて、その配列が約50回繰り返された配列を含む

9

一本鎖DNAを調製した。得られたそれぞれの一本鎖DNAをマイクロタイタープレートに次のように固定した。まず、0.75M塩化ナトリウム、0.15Mトリスー塩酸、および0.15M塩化マグネシウム(pH 8.0)溶液に前記一本鎖DNAを溶解し、4μg/ml溶液を調製した。この一本鎖DNA溶液をマイクロタイタープレートに1ウエル当たり100μlずつ加えた。プレートにふたをして37℃16時間放置した後、洗浄緩衝液(1M塩化ナトリウム、0.1Mトリスー塩酸、2mM塩化マグネシウム、0.1%ツイーン20

(pH 9.3))で3回洗浄した。  
【0031】ヒト白血球より抽出したDNAをサンプルとし、5'側にピオチン標識した配列17および配列18をプライマーとして、PCR法により30サイクルの増幅を行った。得られた増幅物を熱変性した後、その5μlを、ハイブリダイゼーション溶液100μlが入れられた上記の一本鎖DNAが固定されたウエルに添加し、58℃で1時間放置した。液を棄てた後、65℃の3M塩化テトラメチルアンモニウム溶液200μlを加え、65℃で5分間放置した。液を棄て再び65℃の3\*

10

\*M塩化テトラメチルアンモニウム溶液200μlを加え、65℃で10分間放置した。液を棄てた後、酵素希釈液(0.3M塩化ナトリウム、0.1Mトリスー塩酸、2mM塩化マグネシウム、0.05%ツイーン20(pH 7.5))300μlで3回洗浄した。液を除去した後、酵素希釈液で5000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識アビジン(ベクター社製)100μlを加え、室温に15分間放置した。液を除去後、酵素希釈液300μlで3回洗浄した。発色基質液(1.5mM 2,2'-アジノ-ビス-(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホニックアシッド)ジアンモニウム、0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含有0.2M酒石酸緩衝液pH 4.4)を加え、15分間室温で反応させた後、415nmの吸光度を測定した。

【0032】各配列の吸光度は下記の表に示される通りであった。また、その結果より、各サンプルについてDR遺伝子のタイプを判定した。その結果は下記の表に示される通りであった。

【0033】

第1表

サンプル	6.2	K	W
配列1	0.11	0.10	0.10
2	2.32	0.15	0.13
3	0.16	1.99	0.17
4	0.13	1.10	0.12
5	0.11	0.11	0.11
21	0.14	0.42	0.43
7	0.11	0.97	1.49
8	0.15	0.15	0.15
9	0.10	0.11	0.11
10	1.36	0.15	0.14
11	0.12	0.12	0.12
12	0.10	0.36	0.62
13	0.16	0.19	0.15
14	0.13	0.13	0.13
15	0.11	0.12	1.50
16	1.11	1.31	1.78
DRタイプ	(1501-1503/ 1601,0901)	(0301-0303,0401 /0403-0411/1410)	(1301/1302/1304, 1301-1307/1401/ 1402/1405/1409)

【0034】実施例2  
上記実施例1を同様の実験を別のサンプルに対して行った。その結果は次の表に示される通りであった。また、その結果より、各サンプルについてDR遺伝子タイプを

判定した。その結果は下記の表に示される通りであった。

【0035】

第2表

サンプル	OKB17	OKB35	N
------	-------	-------	---



11				12
	配列1	0. 11	0. 33	2. 37
	2	0. 19	3. 00	0. 15
	3	0. 29	1. 15	0. 19
	4	1. 13	0. 17	0. 14
	5	0. 12	0. 13	0. 13
	21	0. 13	0. 18	0. 15
	7	0. 11	0. 11	0. 95
	8	2. 06	0. 19	0. 14
	9	0. 12	0. 12	1. 25
	10	0. 15	0. 39	0. 16
	11	0. 12	1. 95	0. 12
	12	0. 11	0. 12	0. 10
	13	0. 24	0. 20	1. 32
	14	0. 11	0. 13	0. 12
	15	0. 10	0. 10	0. 10
	16	2. 22	2. 07	1. 99

DRタイプ (0401/0403- (1501-1503/ (0101/0102,  
0411/1410, 0701) 1601, 1001) 0801/0804)

### 【0036】実施例3

特開平5-192198号公報に開示された方法に従い、配列6、配列21、配列22、配列23、および配列24のそれぞれについて、その配列が約50回繰り返された配列を含む一本鎖DNAを調製した。得られたそれぞれの一本鎖DNAをマイクロタイタープレートに次のように固定した。まず、0.75M塩化ナトリウム、0.15Mトリス-塩酸、および0.15M塩化マグネシウム(pH8.0)溶液に上記一本鎖DNAを溶解し、4μg/ml溶液を調製した。この一本鎖DNA溶液をマイクロタイタープレートに1ウエル当たり100μlずつ加えた。プレートにふたをして37℃16時間放置した後、洗浄緩衝液(1M塩化ナトリウム、0.1Mトリス-塩酸、2mM塩化マグネシウム、0.1%ツイーン20(pH9.3))で3回洗浄した。

【0037】ヒト白血球より抽出したDNAをサンプルとし、5'側にビオチン標識した配列17および配列18をプライマーとしてPCR法により35サイクルの増幅を行った。得られた増幅物を熱変性した後、その5μ

20 1を、ハイブリダイゼーション溶液100μlが入れた上記の一本鎖DNAが固定されたウエルに添加し、58℃で1時間放置した。液を棄てた後、65℃の3M塩化テトラメチルアンモニウム溶液200μlを加え、65℃で5分間放置した。液を棄てて再び65℃の3M塩化テトラメチルアンモニウム溶液200μlを加え、65℃で10分間放置した。液を棄てた後、酵素希釈液(0.3M塩化ナトリウム、0.1Mトリス-塩酸、2mM塩化マグネシウム、0.05%ツイーン20(pH7.5)200μlで3回洗浄した。液を除去した後、酵素希釈液で2000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識アビジン(BRL社製)100μlを加え、室温に15分間放置した。液を除去後、酵素希釈液200μlで3回洗浄した。発色基質液(4mg p-ニトロフェニルリン酸、1Mジエタノールアミン、0.5mM塩化マグネシウムpH9.8)を加え、60分間室温で反応させた後、405nmの吸光度を測定した。各配列の吸光度は次の表に示される通りであった。

### 【0038】

第3表

		配 列				
サンプル	DRB1タイプ	6	21	22	23	24
22	1201, 0801	1.50	1.37	0.53	0.12	0.08
65	0901, 1201	1.49	1.21	0.41	0.15	0.24
69	0403, 1201	1.88	1.68	0.26	0.16	0.11
107	0803, 1201	1.06	0.75	0.29	0.11	0.07
108	0101, 0406 DRB4*0101	0.11	0.13	0.36	0.06	0.05
64	1502, 1403 DRB3*0101	0.25	0.18	0.54	0.12	0.10
121	0901, 1403 DRB3*0101	0.02	0.14	0.38	0.01	0.00
117	0901, 1101 DRB3*0202	0.02	0.27	0.92	0.01	0.02

## 【0039】実施例4

配列6および21のみについて、実施例3と一部共通するサンプルについて、実施例3と同様の実験を行った。\*

\* 各配列の吸光度は次の表に示される通りであった。

## 【0040】

第4表

サンプル	DRB1タイプ	配列	
		6	21
22	1201, 0801	0.62	0.46
69	0403, 1201	0.45	0.40
107	0803, 1201	1.00	0.96
92	1502, 1101	0.14	0.20
93	0405, 1101	0.10	0.23
117	0901, 1101 DRB3*0202	0.11	0.18
118	1101, 1405	0.14	0.22
64	1502, 1403 DRB3*0101	0.14	0.10

## 【0041】実施例5

特開平5-192198号公報に開示された方法に従い、配列5、配列5a、配列19、配列19a、および配列20のそれぞれについて、その配列が約50回繰り返された配列を含む一本鎖DNAを調製した。得られたそれぞれの一本鎖DNAをマイクロタイタープレートに次のように固定した。まず、0.75M塩化ナトリウム、0.15Mトリス-塩酸、および0.15M塩化マグネシウム(pH8.0)溶液に上記一本鎖DNAを溶解し、4μg/ml溶液を調製した。この一本鎖DNA溶液をマイクロタイタープレートに1ウエル当たり100μlずつ加えた。プレートにふたをして37℃16時間放置した後、洗浄緩衝液(1M塩化ナトリウム、0.1Mトリス-塩酸、2mM塩化マグネシウム、0.1%ツイーン20(pH9.3))で3回洗浄した。

【0042】ヒト白血球より抽出したDNAをサンプルとし、5'側にビオチン標識した配列17および配列18をプライマーとしてPCR法により35サイクルの増幅を行った。得られた増幅物を熱変性した後、その5μl※

※1を、ハイブリダイゼーション溶液100μlが入れられた上記の一本鎖DNAが固定されたウエルに添加し、58℃で1時間放置した。液を棄てた後、65℃の3M塩化テトラメチルアンモニウム溶液200μlを加え、65℃で5分間放置した。液を棄てて再び65℃の3M塩化テトラメチルアンモニウム溶液200μlを加え、65℃で10分間放置した。液を棄てた後、酵素希釈液(0.3M塩化ナトリウム、0.1Mトリス-塩酸、2mM塩化マグネシウム、0.05%ツイーン20(pH7.5))200μlで3回洗浄した。液を除去した後、酵素希釈液で2000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識アビジン(BRL社製)100μlを加え、室温に15分間放置した。液を除去後、酵素希釈液200μlで3回洗浄した。発色基質液(4mg p-ニトロフェニルリン酸、1Mジエタノールアミン、0.5mM塩化マグネシウムpH9.8)を加え、60分間室温で反応させた後、405nmの吸光度を測定した。各配列の吸光度は次の表に示される通りであった。

## 【0043】

第5表

サンプル	DRB1タイプ	配列				
		5	5a	19	19a	20
JRC30		0.855	0.413	0.588	0.485	0.321
69	0403, 1201	0.117	0.091	0.203	0.109	0.095
93	0405, 1101	0.552	0.254	0.398	0.283	0.209
118	1101, 1405	0.582	0.439	0.804	0.365	0.395

## 【0044】実施例6

配列5、配列19、および配列20のみについて、実施例5と一部共通するサンプルについて、実施例5と同様の

の実験を行った。各配列の吸光度は次の表に示される通りであった。

## 【0045】

第6表

サンプル	DRB1タイプ	配列		
		5	19	20
23	0901	0.022	0.057	0.075

6 3	0403	0.026	0.171	0.041
9 2	1502, 1101	0.461	0.392	0.194
9 3	0405, 1101	0.515	0.513	0.266
1 1 7	0901, 1101	0.538	0.470	0.375
1 1 8	1101, 1405	0.421	0.393	0.310
K	0301, 0403	0.040	0.184	0.022

## 【0046】実施例7

特開平5-192198号公報に開示された方法に従い、下記の第7表に示された16種類の配列のそれぞれについて、その配列が約50回繰り返された配列を含む一本鎖DNAを調製した。得られたそれぞれの一本鎖DNAをマイクロタイタープレートに以下のように固定した。まず、0.75M塩化ナトリウム、0.15Mトリスー塩酸、および0.15M塩化マグネシウム(pH 8.0)溶液に前記一本鎖DNAを溶解し、4μg/ml溶液を調製した。この一本鎖DNA溶液をマイクロタイタープレートに1ウエル当たり100μlずつ加えた。プレートにふたをして37℃16時間放置した後洗浄緩衝液(1M塩化ナトリウム、0.1Mトリスー塩酸、2mM塩化マグネシウム、0.1%ツイーン20 (pH 9.3))で3回洗浄した。

【0047】ヒト白血球より抽出したDNAをサンプルとし、に5'側にビチオン標識した配列17および配列18をプライマーとして、PCR法により30サイクルの増幅を行った。得られた増幅物を熱変性した後、その5μlを、ハイブリダイゼーション溶液100μlが入れた上記の一本鎖DNAが固定されたウエルを添加

し、58℃で1時間放置した。液を棄てた後、65℃の3M塩化テトラメチルアンモニウム溶液200μlを加え、65℃で5分間放置した。液を棄て再び65℃の3M塩化テトラメチルアンモニウム溶液200μlを加え、65℃で10分間放置した。液を棄てた後、酵素希釈液(0.3M塩化ナトリウム、0.1Mトリスー塩酸、2mM塩化マグネシウム、0.05%ツイーン20 (pH 7.5))、300μlで3回洗浄する。液を除去した後、酵素希釈液で5000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識アビジン100μlを加え、室温に15分間放置した。液を除去後酵素希釈液300μlで3回洗浄した。発色基質液(1.5mM 2,2'-アジノービス-(3-エチルベンチアゾリン-6-スルホン)ジアンモニウム、0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含有0.2M酒石酸緩衝液pH 4.4)を加え、15分間室温で反応させた後、415nmの吸光度を測定した。

各配列の吸光度は下記の表に示される通りであった。また、その結果より、各サンプルについてDR遺伝子のタイプを判定した。その結果は下記の表に示される通りであった。

## 【0048】

第7表

サンプル	N	O
配列 1	3.58	0.03
2	0.13	0.05
3	0.18	0.10
4	0.09	0.03
5	0.09	0.03
6	0.12	2.36
7	1.20	1.13
8	0.11	0.04
9	2.13	0.04
10	0.20	0.05
11	0.09	0.04
12	0.03	0.43
13	1.57	1.72
14	0.04	0.06
15	0.02	1.24
16	2.77	3.27

DRタイプ(0101/0102, 0801/0804) (1201/1202, 1301/1302/1304)